

English Abstract for Japanese Patent Publication No.: 6-319583:

S1 1 PN="JP 6319583"

?t s1/9/1

1/9/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010139079 **Image available**

WPI Acc No: 1995-040330/199506

XRAM Acc No: C95-017746

of hepatitis C virus helicase gene in baculovirus - useful for large scale prodn. of RNA helicase.

Patent Assignee: SOYAKU GIJUTSU KENKYUSHO KK (SOYA-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 6319583	A	19941122	JP 92249241	A	19920918	199506 B

Priority Applications (No Type Date): JP 92249241 A 19920918

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 6319583	A	9		C12P-021/02	

Abstract (Basic): JP 6319583 A

Prepn. of a helicase encoded by hepatitis C virus (HCV) comprises introducing a HCV helicase gene into the non-essential region of a baculovirus, transferring the baculovirus into an insect cell or larva and recovering the expressed helicase.

USE/ADVANTAGE - The method can prepare RNA helicase in large quantities.

Dwg.0/5

Title Terms: HEPATO; VIRUS; GENE; BACULOVIRUS; USEFUL; SCALE; PRODUCE; RNA
Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12P-021/02

International Patent Class (Additional): C12N-015/51; C12N-015/86;
C12P-021/02; C12R-001-91

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-L0500E; B04-L05E; D05-C03C; D05-H17A3

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M720 M903 N133 N135 Q233 V500 V560 V802 V814

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-319583

(43)公開日 平成6年(1994)11月22日

(51)Int.Cl.⁵ 識別記号 厅内整理番号 F I 技術表示箇所
C 12 P 21/02 Z NA 8214-4B
// C 12 N 15/51
15/86
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:91)

審査請求 未請求 請求項の数1 O.L. (全9頁)

(21)出願番号	特願平4-249241	(71)出願人 592198703 株式会社創薬技術研究所 福島県福島市松川町美郷四丁目1番地の1
(22)出願日	平成4年(1992)9月18日	(72)発明者 下遠野 邦忠 千葉県我孫子市下戸534-34 (72)発明者 土方 誠 東京都中央区佃2-21-11 (72)発明者 丹生谷 博 東京都江東区豊洲4-10-5-1306 (74)代理人 弁理士 本多 小平 (外3名)

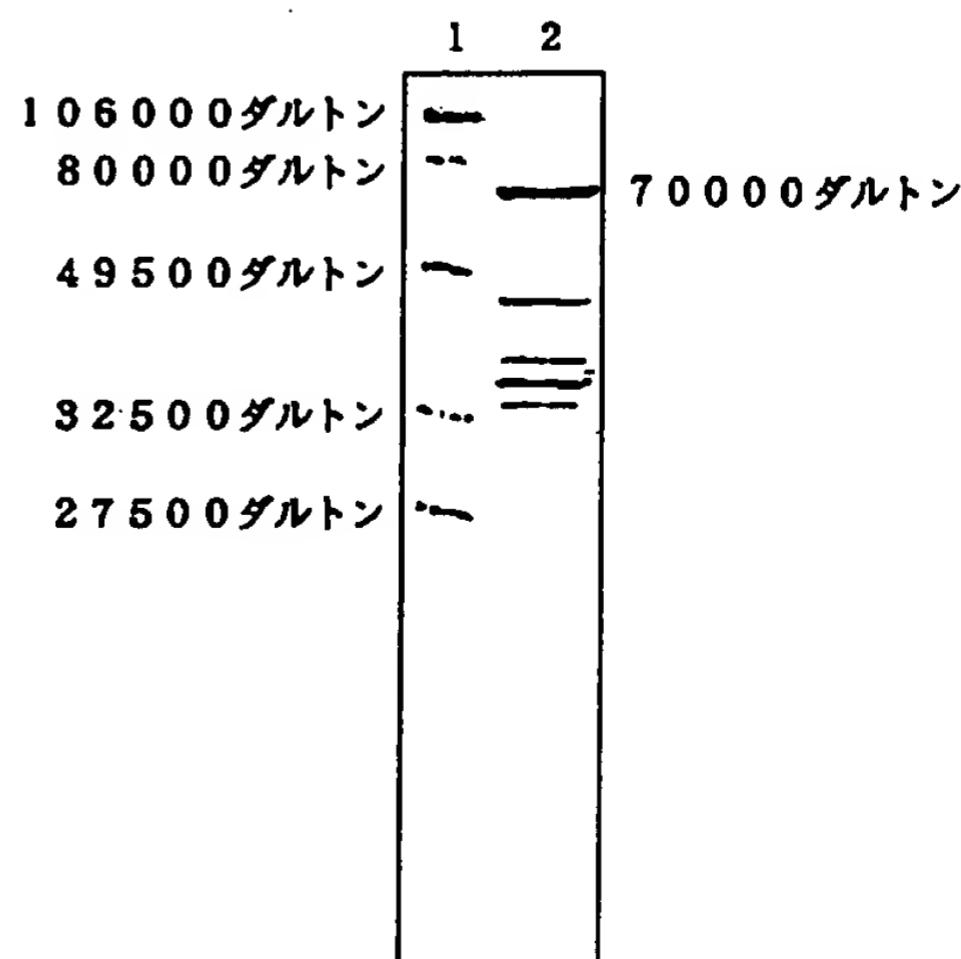
(54)【発明の名称】 C型肝炎ウイルスがコードするヘリカーゼ領域の製造方法

(57)【要約】

【目的】 C型肝炎ウイルスがコードするヘリカーゼ領域を含む蛋白質を大量に簡便に製造する方法を提供する。

【構成】 バキュロウイルスの増殖に非必須なゲノム領域に、C型肝炎ウイルスのコードするヘリカーゼ配列を持つ領域を含む遺伝子を組み込んだ組換えバキュロウイルスを、昆虫細胞あるいは昆虫の幼虫に感染させ、発現したヘリカーゼ配列領域を含む蛋白質を回収する。

第6図



1 分子量マーカー

2 組み換えバキュロウイルスに感染させたSf9細胞

【特許請求の範囲】

【請求項1】 バキュロウイルスの増殖に非必須なゲノム領域に、C型肝炎ウイルスのコードするヘリカーゼ配列を持つ領域を含む遺伝子を組み込んだ組換えバキュロウイルスを、昆虫細胞あるいは昆虫の幼虫に感染させ、発現したヘリカーゼ配列領域を含む蛋白質を回収することを特徴とするC型肝炎ウイルスがコードするヘリカーゼ領域の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は組換えバキュロウイルスを用いて、C型肝炎ウイルスの非構成蛋白質に存在するヘリカーゼ領域を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 C型肝炎ウイルスの遺伝子は輸血後に非A非B肝炎を起こした患者の血清をもとに、その一部が米国のカイロン社のホートンらによりクローニングされサイエンスに報告された (Science. Vol. 244, pp359-362, (1989))。また、日本では国立がんセンターの下遠野らによりクローニングされており、米国のカイロン社のホートンらによりクローニングされた物と遺伝子で22.6%の相違があり日本型のC型肝炎ウイルスとして報告されている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 87, pp9524-9528(1990))。

【0003】 また、フラビウイルス、ベストウイルスとの比較よりC型肝炎ウイルス遺伝子のコードする蛋白質の非構成蛋白質領域、アミノ酸1075番から1185番にセリンプロテアーゼの配列が、1200番から1500番にRNAヘリカーゼの配列が報告されている (加藤ら、FEBS Lett., Vol. 280, pp325-328, (1991))。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 C型肝炎ウイルスの非構成蛋白質の产生にはこのヘリカーゼ活性は必須であり、また当該ウイルスの複製にも必須であると考えられる。従って当該ヘリカーゼ活性の阻害剤は抗ウイルス作用を持つと考えられるため、その詳細な解析はC型肝炎ウイルスの感染予防および治療の観点から非常に重要である。

【0005】 その目的のため当該ヘリカーゼの性質の解析および阻害剤のスクリーニングのためにその大量に簡便な製造方法が必要である。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らはC型肝炎ウイルスの非構成蛋白質をコードする遺伝子のヘリカーゼ活性領域を、バキュロウイルスの増殖に非必須なゲノム領域に組み込んだ組換えバキュロウイルスを昆虫細胞あるいは昆虫の幼虫に感染させ、発現したヘリカーゼ領域を含む蛋白質を回収することにより本発明を完成了。

【0007】 本発明について組換えウイルスの作製に供されるウイルスはバキュロウイルスに分類されるものな

らばいかなるものでもよく、例えばオートグラファ・カルフォニカ(*Autographa californica*)、トリコブルシア・ニ(*Trichoplusia ni*)、ラキブルシア・オウ(*Rachiplusia ou*)、ガレリア・メロネラ(*Galleria mellonella*)、あるいは、ボンビックス・モリ(*Bombyx mori*)、などがある。

【0008】 これらのウイルスの中でもオートグラファ・カリフォルニカは従来から広く研究されてきており、最適である。

10 【0009】 C型肝炎ウイルスの遺伝子は前述したように、米国のカイロン社のホートンらによりクローニングされた物、日本の国立がんセンターの下遠野らによりクローニングされた物など幾つか知られている。どれについても非構成蛋白質をコードする遺伝子の前半にRNAヘリカーゼ特有の配列が存在する。これらいずれの配列を用いても同様の結果が得られる。

【0010】 バキュロウイルスに組み込む非構成蛋白質のRNAヘリカーゼ配列の領域は、この非構成蛋白質の前半に存在する、グリシン-X-グリシン-リジンの配列、その数10個のアミノ酸の後に、アスパラギン酸-グルタミン酸-X-ヒスチジンの配列 (Xはある1個のアミノ酸) を含む領域であればよいが、好ましくはその領域の前後、数10個程度のアミノ酸を含む蛋白質領域が良い。

【0011】 具体的には、例えば下遠野ら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 87, pp9524-9528(1990))によりクローニングされた遺伝子の場合、少なくとも第1図～第4図に示されるアミノ酸1233番から1236番のグリシン-X-グリシン-リジンの配列、1316番から13

30 19番のアスパラギン酸-グルタミン酸-X-ヒスチジンの配列を含む領域であればよいが、好ましくは1233番のグリシンの前10個のアミノ酸、1319番のヒスチジンの後10個のアミノ酸を含む蛋白質領域が良い。

【0012】 また、本発明において上記遺伝子と実質的に同一の機能を有する範囲において、修飾された遺伝子、即ち、塩基配列が置換、挿入、欠失したものでもよく、もちろん、実質的に同一の機能を有するかぎりアミノ酸配列が異なる程度に修飾されたものであってよい。

【0013】 組み換えウイルスの作成に当たっては、まずバキュロウイルスの増殖に非必須な遺伝子領域を組み込んだ第一の組み換えベクターが作成される。

【0014】 この場合、前記領域にバキュロウイルス内で機能するプロモーターを存在させることが必要であり、さらにプロモーターダウン流に適当な制限酵素切断配列を有する合成リンカーを挿入することが好ましい。

【0015】 ここでいう増殖に非必須な遺伝子領域とは、例えばバキュロウイルスのポリヘドリン遺伝子 (L. K. ミラーら, Science. Vol. 219, pp715-721, (198

3) など、外来性遺伝子の挿入による変異を受けても実質上ウイルスの増殖に影響を及ぼさない領域を言う。

【0016】また、パキュロウイルス内で機能するプロモーターとは、合成、天然を問わずパキュロウイルスが保有する転写の系でプロモーターとして有効に機能しえるものであればいかなる塩基配列のものでも良く、例えばパキュロウイルスのポリヘドリンをコードする遺伝子のプロモーターがあげられる。

【0017】本発明においては、第一の組み換えベクターのプロモータ下流にC型肝炎ウイルスの非構成蛋白質に存在するRNAヘリカーゼ領域を含む遺伝子配列を挿入して第二の組み換えベクターを作成する。挿入方法は、例えば第一のベクターのプロモータ下流に入為的に付与された制限酵素切断配列を利用して挿入すれば良い。次にパキュロウイルスの全ゲノムとこの第二の組み換えベクターを混合した後に、昆虫細胞にトランスフェクションにより導入し、ベクター遺伝子とウイルスゲノム遺伝子の間に相同組み換えを起こさせ、組み換えパキュロウイルスを構築する。ここで用いられる昆虫細胞はパキュロウイルスが増殖可能であればよく、例えばスピードブテラ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*)などがあげられる。

【0018】こうして得られた組み換えパキュロウイルスを感染しやすい昆虫細胞または昆虫の幼虫に感染させ、発現した蛋白質を回収する。感染に使用する昆虫細胞または昆虫の幼虫はパキュロウイルスが増殖可能であれば特に限定されないが、例えば細胞増殖の早い昆虫細胞のスピードブテラ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*)などが好ましい。

【0019】本発明によれば、パキュロウイルスの増殖に非必須な遺伝子領域にC型肝炎ウイルスのRNAヘリカーゼ配列を含む非構成蛋白質領域をパキュロウイルス内で機能するプロモーターと共に組み込まれた組み換えパキュロウイルスを得て、この組み換えウイルスを昆虫細胞または昆虫の幼虫に感染させ、蛋白質を発現させることにより大量に簡便に目的蛋白質を製造することができる。

【0020】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。

【0021】実施例1

(1) C型肝炎ウイルスの非構成蛋白質領域に存在するRNAヘリカーゼ配列の領域を含む遺伝子を組み込んだ第二の組み換えベクターの作製(第5図を参照)
C型肝炎ウイルスの遺伝子の塩基3018番の制限酵素RsrIIサイトから塩基6049番の制限酵素SmaIサイトを切り出し(第1図～第4図を参照)、RsrIIサイト側に開始コドンのメチオニンを含むリンカー1を、SmaIサイト側にリンカー2をライゲーションし、結合した後リン酸化する。東洋紡績(株)製のベク

ターpTZ18UをEcoRI、HindIIIで切断し、切断したベクターを精製し脱リン酸化し、前述したリンカー1、2を結合したC型肝炎ウイルスの遺伝子とライゲーションをし、一度、大腸菌にトランスフォーメーションにより導入し増やす。

【0022】その得られたプラスミドを再度EcoRI、HindIIIで切断し、リンカー1、2を結合したC型肝炎ウイルスの遺伝子を得る。EcoRIサイト側にはリンカー3を、HindIIIサイト側には終始コドンを含むリンカー4をライゲーションし、結合した後リン酸化する。PHARMIGEN社製のパキュロウイルストラスファーベクターpVL941(第二の組み換えベクター)をBamHIで切断し、脱リン酸化し、前述したリンカー3、4を結合したC型肝炎ウイルスの遺伝子とライゲーションをし、一度、大腸菌にトランスフォーメーションにより導入し増やし第二の組み換えベクターを作製する。

【0023】(2)組み換えパキュロウイルスの作製
PHARMIGEN社製のトランスフェクションキットBACULOGOLDを使用し、前述したパキュロウイルストラスファーベクターpVL941(第二の組み換えベクター)とパキュロウイルス遺伝子を混合し、スピードブテラ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*)の細胞Sf9に挿入する。このトランスフェクションキットのパキュロウイルス遺伝子はパキュロウイルストラスファーベクターと相同組み換えを起こさないとウイルスとして増殖できないようになっているため、相同組み換えを起こしたウイルスだけが得られる。

【0024】細胞に挿入して一週間程度の後、この組み換えウイルスを回収する。

【0025】(3)組み換えパキュロウイルスによるC型肝炎ウイルスの非構成蛋白質に存在するヘリカーゼ配列領域の製造
得られた組み換えパキュロウイルスを細胞Sf9に感染させ、培養3日後に回収する。ウエスタンプロット法により発現蛋白質の確認を行った。

【0026】その結果、分子量約70000ダルトンの蛋白質を产生していることが判明した(第6図を参照)。C型肝炎ウイルス遺伝子のRsrIIサイトからSmaIサイトの領域には、その分子内に含まれるプロテアーゼにより切断される場所が2か所含まれており、RNAヘリカーゼ配列の領域は分子量70000ダルトンの蛋白質として产生されることが推定され、実際に発現した蛋白質と同一の分子量である。

【0027】ウエスタンプロット法に用いた抗血清は、下遠野らにより報告(Jpn. J. Cancer Res. Vol. 83, pp264-268, (1992))されている蛋白質O7(塩基4224番から塩基4963番)により得られた抗血清を用いた。

【0028】

【発明の効果】本発明は、組み換えパキュロウイルスを利

用することにより、大量に簡便にC型肝炎ウイルス遺伝子の非構成蛋白質に存在するRNAヘリカーゼの領域を製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】第1図は、C型肝炎ウイルス遺伝子(Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 87, pp9524-9528(1990))の(その1)塩基1番~2591番を示す。

【図2】第2図は、同C型肝炎ウイルス遺伝子の(その2)塩基2592番~5183番を示す。

【図3】第3図は、同C型肝炎ウイルス遺伝子の(その3)塩基5184番~7775番を示す。

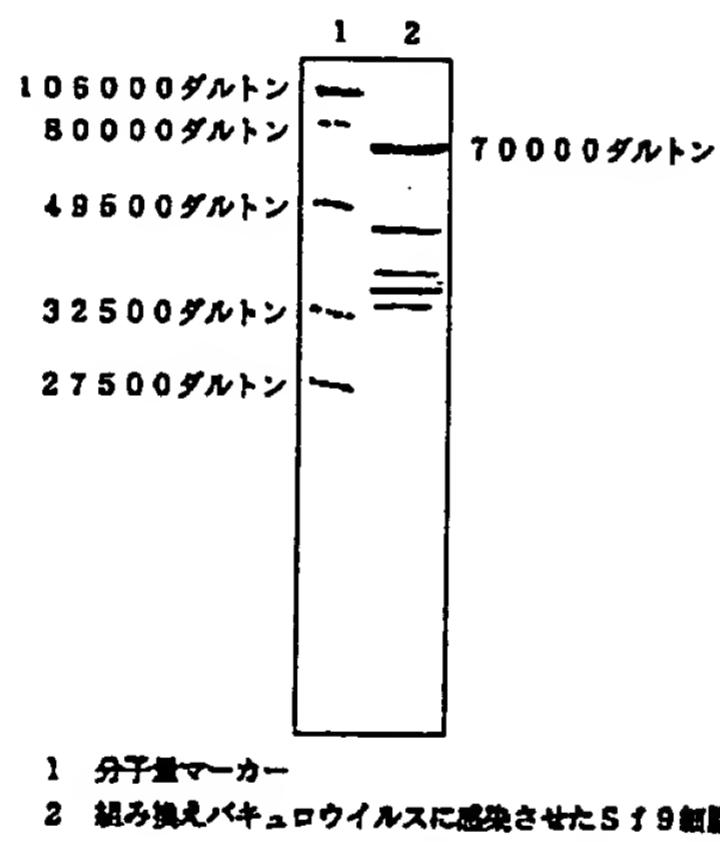
【図4】第4図は、同C型肝炎ウイルス遺伝子の(その4)塩基7776番~9413番を示す。

【図5】第5図は、C型肝炎ウイルスの非構成蛋白質に存在するセリンプロテアーゼ活性領域を含む遺伝子を組み込んだパキュロウイルストラ NS ファーベクター pV L 941 (第二の組み換えベクター) の作製手順を示す。

【図6】第6図は、組み換えパキュロウイルスにより產生した蛋白質のウエスタンプロット法による結果を示す。

【図6】

第6図



(5)

(6)

第2図(その2)

(8)

[图4]

913
 9215
 9359
 9414
 9501
 9666
 9827
 9921
 10014
 1010
 1020
 1030
 1040
 1050
 1060
 1070
 1080
 1090
 1100
 1110
 1120
 1130
 1140
 1150
 1160
 1170
 1180
 1190
 1200
 1210
 1220
 1230
 1240
 1250
 1260
 1270
 1280
 1290
 1300
 1310
 1320
 1330
 1340
 1350
 1360
 1370
 1380
 1390
 1400
 1410
 1420
 1430
 1440
 1450
 1460
 1470
 1480
 1490
 1500
 1510
 1520
 1530
 1540
 1550
 1560
 1570
 1580
 1590
 1600
 1610
 1620
 1630
 1640
 1650
 1660
 1670
 1680
 1690
 1700
 1710
 1720
 1730
 1740
 1750
 1760
 1770
 1780
 1790
 1800
 1810
 1820
 1830
 1840
 1850
 1860
 1870
 1880
 1890
 1900
 1910
 1920
 1930
 1940
 1950
 1960
 1970
 1980
 1990
 2000
 2010
 2020
 2030
 2040
 2050
 2060
 2070
 2080
 2090
 2100
 2110
 2120
 2130
 2140
 2150
 2160
 2170
 2180
 2190
 2200
 2210
 2220
 2230
 2240
 2250
 2260
 2270
 2280
 2290
 2300
 2310
 2320
 2330
 2340
 2350
 2360
 2370
 2380
 2390
 2400
 2410
 2420
 2430
 2440
 2450
 2460
 2470
 2480
 2490
 2500
 2510
 2520
 2530
 2540
 2550
 2560
 2570
 2580
 2590
 2600
 2610
 2620
 2630
 2640
 2650
 2660
 2670
 2680
 2690
 2700
 2710
 2720
 2730
 2740
 2750
 2760
 2770
 2780
 2790
 2800
 2810
 2820
 2830
 2840
 2850
 2860
 2870
 2880
 2890
 2900
 2910
 2920
 2930
 2940
 2950
 2960
 2970
 2980
 2990
 3000
 3010
 3020
 3030
 3040
 3050
 3060
 3070
 3080
 3090
 3100
 3110
 3120
 3130
 3140
 3150
 3160
 3170
 3180
 3190
 3200
 3210
 3220
 3230
 3240
 3250
 3260
 3270
 3280
 3290
 3300
 3310
 3320
 3330
 3340
 3350
 3360
 3370
 3380
 3390
 3400
 3410
 3420
 3430
 3440
 3450
 3460
 3470
 3480
 3490
 3500
 3510
 3520
 3530
 3540
 3550
 3560
 3570
 3580
 3590
 3600
 3610
 3620
 3630
 3640
 3650
 3660
 3670
 3680
 3690
 3700
 3710
 3720
 3730
 3740
 3750
 3760
 3770
 3780
 3790
 3800
 3810
 3820
 3830
 3840
 3850
 3860
 3870
 3880
 3890
 3900
 3910
 3920
 3930
 3940
 3950
 3960
 3970
 3980
 3990
 4000
 4010
 4020
 4030
 4040
 4050
 4060
 4070
 4080
 4090
 4100
 4110
 4120
 4130
 4140
 4150
 4160
 4170
 4180
 4190
 4200
 4210
 4220
 4230
 4240
 4250
 4260
 4270
 4280
 4290
 4300
 4310
 4320
 4330
 4340
 4350
 4360
 4370
 4380
 4390
 4400
 4410
 4420
 4430
 4440
 4450
 4460
 4470
 4480
 4490
 4500
 4510
 4520
 4530
 4540
 4550
 4560
 4570
 4580
 4590
 4600
 4610
 4620
 4630
 4640
 4650
 4660
 4670
 4680
 4690
 4700
 4710
 4720
 4730
 4740
 4750
 4760
 4770
 4780
 4790
 4800
 4810
 4820
 4830
 4840
 4850
 4860
 4870
 4880
 4890
 4900
 4910
 4920
 4930
 4940
 4950
 4960
 4970
 4980
 4990
 5000
 5010
 5020
 5030
 5040
 5050
 5060
 5070
 5080
 5090
 5100
 5110
 5120
 5130
 5140
 5150
 5160
 5170
 5180
 5190
 5200
 5210
 5220
 5230
 5240
 5250
 5260
 5270
 5280
 5290
 5300
 5310
 5320
 5330
 5340
 5350
 5360
 5370
 5380
 5390
 5400
 5410
 5420
 5430
 5440
 5450
 5460
 5470
 5480
 5490
 5500
 5510
 5520
 5530
 5540
 5550
 5560
 5570
 5580
 5590
 5600
 5610
 5620
 5630
 5640
 5650
 5660
 5670
 5680
 5690
 5700
 5710
 5720
 5730
 5740
 5750
 5760
 5770
 5780
 5790
 5800
 5810
 5820
 5830
 5840
 5850
 5860
 5870
 5880
 5890
 5900
 5910
 5920
 5930
 5940
 5950
 5960
 5970
 5980
 5990
 6000
 6010
 6020
 6030
 6040
 6050
 6060
 6070
 6080
 6090
 6100
 6110
 6120
 6130
 6140
 6150
 6160
 6170
 6180
 6190
 6200
 6210
 6220
 6230
 6240
 6250
 6260
 6270
 6280
 6290
 6300
 6310
 6320
 6330
 6340
 6350
 6360
 6370
 6380
 6390
 6400
 6410
 6420
 6430
 6440
 6450
 6460
 6470
 6480
 6490
 6500
 6510
 6520
 6530
 6540
 6550
 6560
 6570
 6580
 6590
 6600
 6610
 6620
 6630
 6640
 6650
 6660
 6670
 6680
 6690
 6700
 6710
 6720
 6730
 6740
 6750
 6760
 6770
 6780
 6790
 6800
 6810
 6820
 6830
 6840
 6850
 6860
 6870
 6880
 6890
 6900
 6910
 6920
 6930
 6940
 6950
 6960
 6970
 6980
 6990
 7000
 7010
 7020
 7030
 7040
 7050
 7060
 7070
 7080
 7090
 7100
 7110
 7120
 7130
 7140
 7150
 7160
 7170
 7180
 7190
 7200
 7210
 7220
 7230
 7240
 7250
 7260
 7270
 7280
 7290
 7300
 7310
 7320
 7330
 7340
 7350
 7360
 7370
 7380
 7390
 7400
 7410
 7420
 7430
 7440
 7450
 7460
 7470
 7480
 7490
 7500
 7510
 7520
 7530
 7540
 7550
 7560
 7570
 7580
 7590
 7600
 7610
 7620
 7630
 7640
 7650
 7660
 7670
 7680
 7690
 7700
 7710
 7720
 7730
 7740
 7750
 7760
 7770
 7780
 7790
 7800
 7810
 7820
 7830
 7840
 7850
 7860
 7870
 7880
 7890
 7900
 7910
 7920
 7930
 7940
 7950
 7960
 7970
 7980
 7990
 8000
 8010
 8020
 8030
 8040
 8050
 8060
 8070
 8080
 8090
 8010
 8020
 8030
 8040
 8050
 8060
 8070
 8080
 8090
 8100
 8110
 8120
 8130
 8140
 8150
 8160
 8170
 8180
 8190
 8110
 8120
 8130
 8140
 8150
 8160
 8170
 8180
 8190
 8200
 8210
 8220
 8230
 8240
 8250
 8260
 8270
 8280
 8290
 8210
 8220
 8230
 8240
 8250
 8260
 8270
 8280
 8290
 8300
 8310
 8320
 8330
 8340
 8350
 8360
 8370
 8380
 8390
 8310
 8320
 8330
 8340
 8350
 8360
 8370
 8380
 8390
 8400
 8410
 8420
 8430
 8440
 8450
 8460
 8470
 8480
 8490
 8410
 8420
 8430
 8440
 8450
 8460
 8470
 8480
 8490
 8500
 8510
 8520
 8530
 8540
 8550
 8560
 8570
 8580
 8590
 8510
 8520
 8530
 8540
 8550
 8560
 8570
 8580
 8590
 8600
 8610
 8620
 8630
 8640
 8650
 8660
 8670
 8680
 8690
 8610
 8620
 8630
 8640
 8650
 8660
 8670
 8680
 8690
 8700
 8710
 8720
 8730
 8740
 8750
 8760
 8770
 8780
 8790
 8710
 8720
 8730
 8740
 8750
 8760
 8770
 8780
 8790
 8800
 8810
 8820
 8830
 8840
 8850
 8860
 8870
 8880
 8890
 8810
 8820
 8830
 8840
 8850
 8860
 8870
 8880
 8890
 8900
 8910
 8920
 8930
 8940
 8950
 8960
 8970
 8980
 8990
 9000
 9010
 9020
 9030
 9040
 9050
 9060
 9070
 9080
 9090
 9010
 9020
 9030
 9040
 9050
 9060
 9070
 9080
 9090
 9100
 9110
 9120
 9130
 9140
 9150
 9160
 9170
 9180
 9190
 9200
 9210
 9220
 9230
 9240
 9250
 9260
 9270
 9280
 9290
 9210
 9220
 9230
 9240
 9250
 9260
 9270
 9280
 9290
 9300
 9310
 9320
 9330
 9340
 9350
 9360
 9370
 9380
 9390
 9310
 9320
 9330
 9340
 9350
 9360
 9370
 9380
 9390
 9400
 9410
 9420
 9430
 9440
 9450
 9460
 9470
 9480
 9490
 9410
 9420
 9430
 9440
 9450
 9460
 9470
 9480
 9490
 9500
 9510
 9520
 9530
 9540
 9550
 9560
 9570
 9580
 9590
 9510
 9520
 9530
 9540
 9550
 9560
 9570
 9580
 9590
 9600
 9610
 9620
 9630
 9640
 9650
 9660
 9670
 9680
 9690
 9610
 9620
 9630
 9640
 9650
 9660
 9670
 9680
 9690
 9700
 9710
 9720
 9730
 9740
 9750
 9760
 9770
 9780
 9790
 9710
 9720
 9730
 9740
 9750
 9760
 9770
 9780
 9790
 9800
 9810
 9820
 9830
 9840
 9850
 9860
 9870
 9880
 9890
 9810
 9820
 9830
 9840
 9850
 9860
 9870
 9880
 9890
 9900
 9910
 9920
 9930
 9940
 9950
 9960
 9970
 9980
 9990
 10000

【図5】

第5図

